

# Evaluación de marcadores moleculares de cloroplastos y nucleares, para su uso en identificación molecular de germoplasmas de orquídeas

Pablo Andrés Londoño-Lopera<sup>‡Ω</sup>, Diego Fernando Villanueva-Mejía<sup>‡α</sup>

<sup>‡</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Carrera 49 No. 7 sur 50, Medellín, Antioquia, Colombia.

<sup>Ω</sup>Estudiante, Pregrado de Biología. Ejecutor del trabajo de grado.

<sup>α</sup>PhD. en Biotecnología, Profesor Titular, Departamento de Ciencias Biológicas. Asesor del trabajo de grado.

## Resumen

Las orquídeas son el grupo de plantas con flores más diverso y evolucionado del mundo; presentando especificidad para la polinización, toma de agua y asociaciones con hongos específicos para satisfacer sus necesidades nutricionales. Son plantas de gran importancia para los ecosistemas que habitan, ya que contribuyen directamente a su regulación hídrica. Además, proveen refugio y alimento a diversos organismos como insectos, aves y mamíferos. Asimismo, las orquídeas son importantes comercialmente como plantas ornamentales, medicinales, como flor de corte para exportación y para extracción de esencias como la vainilla. Es por ello que al momento de propagarlas y distribuirlas se hace necesario tenerlas plenamente identificadas para conservar adecuadamente las características de los germoplasmas. Debido a que se ha demostrado que las características fenotípicas son insuficientes para la identificación de estas plantas, se desarrolló este estudio con el objeto de evaluar el uso de marcadores moleculares de cloroplasto (*MAT-K*, *YCF-1* y *TRNL-TRNF*) y nuclear (*ITS*) para la identificación de diferentes géneros de orquídeas, en estado de plántula. En esta investigación se estandarizaron protocolos de PCR para los marcadores moleculares presentados, con el fin de desarrollar técnicas replicables de identificación molecular de orquídeas. Se realizó la identificación a nivel de género de los germoplasmas analizados utilizando el marcador molecular *TRNL-TRNF*. De esta manera se genera conocimiento de base científica y tecnológica que ayude al aprovechamiento sostenible y responsable de orquídeas a nivel nacional.

**Palabras clave:** Plantas ornamentales; Caracterización molecular; Orchidaceae; *Cattleya*.

## Introducción

Dentro de las plantas con flores, las orquídeas hacen parte de uno de los grupos con mayor abundancia del planeta. Las orquídeas se encuentran dentro de las monocotiledóneas más avanzadas en la evolución, teniendo especificidad para la polinización, toma de agua y asociaciones con hongos específicos para satisfacer sus necesidades nutricionales, incluyendo la germinación de las semillas (Aguilar Palma, 2003). Erróneamente se piensa que las orquídeas son parasitarias por crecer sobre otras plantas. En realidad, las orquídeas buscan alcanzar las partes altas de los árboles para así adquirir el máximo de luz posible, alimentándose de la descomposición de las hojas de los árboles y de los nutrientes que captan del agua de lluvia; nunca de su hospedero (Cavero *et al.*, 1991). Las orquídeas cumplen diversas e importantes funciones ecológicas en los ecosistemas que habitan; entre estos, resalta el aumento de la masa vegetal en el dosel, la cual intercepta la neblina y las nubes bajas, aumentando la precipitación local y reduciendo así el volumen e impacto del escurrimiento del agua (Castellanos Castro y Torres Morales, 2018). Esta barrera de masa vegetal crea también un gradiente en términos de evapotranspiración y humedad, contribuyendo así al enfriamiento del dosel, y por tanto a la condensación de agua en el bosque (Castellanos Castro y Torres Morales, 2018). Otra importante contribución de las orquídeas en los ecosistemas es que están asociadas a un gran

número de hongos formadores de micorrizas, las cuales tienen importantes funciones en el ciclo de los nutrientes. De igual forma, las orquídeas proveen refugio y alimento a diversos organismos como hormigas, abejas, avispas, mariposas, aves y mamíferos como murciélagos (Castellanos Castro y Torres Morales, 2018).

Según “The Plant List” (2020) la familia Orchidaceae es una de las más grandes en cuanto a géneros (899) y especies (25.000) de angiospermas. Su mayor diversidad se centra en la región tropical, donde en su mayoría se encuentran especies epífitas (Aguilar Palma, 2003; Vallejo *et al.*, 2018). Esta familia pertenece a la clase Liliopsida, siendo el clado basal del orden Asparagales (Moreno Palacios, 2018). La taxonomía del grupo se ha enfocado desde distintos puntos, sin embargo, Dessler (1981), sugiere a las orquídeas en una sola familia que se divide en seis subfamilias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchioideae, Spiranthoideae, Epidendroideae y Vandoideae (Moreno Palacios, 2018). Entre estas, Epidendroideae y Vandoideae involucran a más de la mitad de las especies que integran a la familia (Moreno Palacios, 2018). Sin embargo, la propuesta aceptada es la de Chase (2005), que agrupa a las orquídeas en sólo una familia (Orchidaceae) y cinco subfamilias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanillioideae, Orchioideae y Epidendroideae (Moreno Palacios, 2018).

De las 25.000 especies de orquídeas que existen en el mundo, 4.270 son nativas de Colombia y 1.572 son endémicas; además, la flor nacional es la especie de orquídea *Cattleya trianae* (Vallejo *et al.*, 2018). Colombia es considerada una de las naciones de mayor diversidad en cuanto a variedad de germoplasma vegetal (Vallejo *et al.*, 2018). Por ende, es de gran importancia atender la necesidad de realizar estudios para la identificación a nivel molecular de los principales géneros/especies de orquídeas de interés ecológico y comercial del país. Así, viveros o empresas legalmente constituidas que posean un soporte molecular de los géneros/especies de orquídeas que comercializan, puedan generar un valor agregado de sus productos con estos estudios. Por esta razón, nacen iniciativas empresariales en el país como Natural Vitro, Spin-off de la Universidad EAFIT; la cual tiene como uno de sus principales objetivos la protección del patrimonio biológico del país representado en las orquídeas, fortaleciendo procesos de investigación y desarrollo con fines comerciales en el uso sostenible de recursos naturales del país.

A raíz de la gran complejidad para definir los límites entre los géneros, existen debates taxonómicos entre los científicos, razón por la cual los estudios actuales se apoyan principalmente en el uso de la biología molecular para definir la posición taxonómica de las especies (Aguilar Palma, 2003). Entre las diversas técnicas de la biología molecular utilizadas para definir la posición taxonómica de diferentes especies de orquídeas, resaltan las nuevas técnicas de secuenciación de próxima generación que han sido de gran ayuda para el estudio de la evolución genómica y las relaciones interespecíficas de organismos basados en recursos de conjuntos de datos genómicos a gran escala, como secuencias completas de plastidios (Lin *et al.*, 2018). Estas técnicas son eficientes para la caracterización del germoplasma cuando los datos morfológicos no pueden distinguir entre variedades/germoplasma (Kumar *et al.*, 2018). Se basan en el uso de marcadores moleculares que pueden identificar características específicas de cada especie y pueden definir relaciones genéticas entre ellas (Aguilar Palma, 2003). Estos marcadores moleculares son caracteres que se pueden usar directa o indirectamente para obtener información sobre la genética de un organismo, los cuales pueden ser regiones codificantes, aunque la mayoría de los polimorfismos ocurren en regiones no codificantes (Aguilar Palma, 2003; Moreno Palacios, 2018).

Para reconstruir filogenias de orquídeas se han utilizado en su mayoría secuencias de tipo nuclear y mitocondrial, pero en la actualidad se ha potenciado el estudio de marcadores cloroplásticos, dado que contienen regiones poco variables, son útiles debido a su alta tasa de

mutaciones aleatorias independientes por la ausencia de presión selectiva; además, son fáciles de amplificar y los genes poseen intervalos de baja evolución, siendo así de gran importancia cuando se buscan loci que puedan dar relaciones entre especies o géneros en análisis filogenéticos (Bellusci *et al.*, 2008; Calderón Parreño y Prexl Zurita, 2019). Asimismo, las regiones de ADN cloroplástico (cpADN) han mostrado bajos niveles de homoplasia, lo que los hace adecuados para lograr una comparación entre taxones estrechamente relacionados que aún exhiben un alto nivel de genes (Bellusci *et al.*, 2008).

A nivel mundial, los marcadores moleculares más utilizados son *MATK*, *RPOC1*, *RBCL*, *YCF1*, *NDHF*, *PSAB* y *TRNL-TRNF* provenientes de regiones del genoma de cloroplasto; los genes nucleares *ITS*, *XDH*, y genes mitocondriales como *MATR*. Entre las angiospermas se han utilizado los marcadores moleculares *MAT-K*, *RBCL*, *ITS1*, *TRNH-PSBA*, *RPOC1*, *YCF-5*, *RPOB2*, *NDHJ* y *ACCD* (Kress y Erickson, 2007). A nivel de orden (Caryophyllales), se han utilizado los marcadores moleculares *MAT-K*, *RBCL* y *ATPB* (Cuénoud *et al.*, 2002). A nivel de familia (Orchidaceae) *MAT-K*, *RBCL*, *YCF-1* y *NDHF* (Li *et al.*, 2021); y dentro de las subfamilias (Cypripedioideae, Epidendroideae y Orchidoideae) se han utilizado *MAT-K*, *YCF-1*, *ITS* y *NDHF* (Neyland y Urbatsch, 1996; Neubig *et al.*, 2009). Finalmente, a nivel de género (*Epidendroideae*, *Pleurothallis*, *Maxillaria*, *Epidendrum*, *Elleanthus*, *Artorima*, *Prosthechea*, *Sobralia*, *Oncidium*, *Aerides*, *Bulbophyllum*, *Coelogyne*, *Cottonia*, *Dendrobium*, *Paphilopedium* y *Tria*) *MAT-K*, *YCF-1*, *RBCL* e *ITS* son los más utilizados (Asahina *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2017; Deepti Srivastava, 2020). Sin embargo, solo *MATK*, *PSAB*, *YCF1*, *XDH* y *RBCL* son ampliamente usados en la identificación de organismos de la familia Orchidiaceae (Chattopadhyay *et al.*, 2017; Calderón Parreño y Prexl Zurita, 2019).

Teniendo en cuenta lo anterior, es imperativo desarrollar técnicas replicables que no dependan de marcadores morfológicos tradicionales para la identificación de estas plantas. A su vez es necesario generar nuevo conocimiento con base científica y tecnológica que ayude al aprovechamiento responsable y sostenible de las orquídeas. Por lo tanto, el presente estudio pretende evaluar el uso de marcadores moleculares de cloroplastos y nucleares para la identificación a nivel molecular de germoplasmas de diferentes orquídeas (*Cattleya*, *Dracula*, *Encyclia*, *Lockartia*, *Miltonia*, *Miltoniopsis*, *Peristeria*, *Spanthoglotitis* y *Stanhopea*) pertenecientes a la Spin-off Natural Vitro del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad EAFIT.

## **Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

Las muestras de germoplasmas de los diferentes géneros de orquídeas fueron proporcionadas por el laboratorio de biotecnología vegetal de la universidad EAFIT, en conjunto con la Spin-off Natural Vitro. En total fueron adquiridas 15 muestras de germoplasmas de diferentes géneros y especies de orquídeas en su estado de plántula; a cada una se le realizó extracción de ADN.

Las muestras obtenidas de material vegetal fueron nombradas OR.3-OR.17, donde cada una de estas pertenece a una especie diferente de los géneros *Cattleya*, *Dracula*, *Encyclia*, *Lockartia*, *Miltonia*, *Miltoniopsis*, *Peristeria*, *Spanthoglotitis* y *Stanhopea*, previamente identificados por Natural Vitro con base en caracteres fenotípicos.

### **Extracción de ADN:**

Se siguieron los protocolos de extracción de ADN total por CTAB para hojas de *Sacha Inchi* (Restrepo Osorio *et al.*, 2020) y el protocolo para el método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Murray y Thompson, 1980; Wagner *et al.*, 1987).

Se tomaron únicamente las hojas de las muestras de germoplasma y fueron procesadas tal como se describe a continuación. Se inició el proceso haciendo uso de un mortero estéril para macerar las muestras junto con nitrógeno líquido. De cada muestra de germoplasma adquirida se utilizó el total de cada muestra. Mientras que se pulveriza la muestra de hoja en el mortero, se incubó en baño maría el CTAB a precalentarse por 20 minutos a 65°C. Se recogió el polvo fino y se agregó a un tubo Eppendorf estéril de 2 mL junto con 400 µl de CTAB 2X y 4 µl de β-Mercaptoetanol (utilizado para desnaturalizar las proteínas mediante el rompimiento de los puentes disulfuro) (Bermúdez Guzmán *et al.*, 2016). Las muestras se ponen en vortex por unos segundos y se incuban a 65°C en baño maría por 30 minutos. Posteriormente se agregan 300 µl de cloroformo y se pasan a vortex por un minuto, una vez realizado este paso se centrifugan a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Después se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL y se agrega Cloroformo volumen específico, se pasa de nuevo al vortex por un minuto y se centrifuga a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez centrifugadas las muestras se transfiere el sobrenadante y se agrega Isopropanol volumen específico, se agita por inmersión 10 veces y se deja en la nevera de -20°C durante toda la noche para lograr así la precipitación del ADN (Bermúdez Guzmán *et al.*, 2016).

Al día siguiente se centrifugan las muestras a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante con cuidado de no descartar el pellet, se agregan 200 µl de etanol al 70% y se repiten estos pasos una vez más. Se centrifugan las muestras durante 10 minutos a 13000 rpm a 4°C y se secan las muestras durante 20 minutos haciendo uso de SpeedVac. Una vez secas las muestras se resuspenden en 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril grado PCR. Opcionalmente se pueden agregar 1 µl de RNasa a cada muestra. Por último, se incuban a 37°C durante una hora y se almacenan en nevera de -20°C hasta uso.

Para cada muestra de orquídea se realizaron cuatro replicas en el proceso de extracción de ADN para aumentar las probabilidades de lograr una extracción de ADN exitosa.

#### **Calidad y cuantificación del ADN:**

Para estimar la calidad del ADN extraído, se realizó electroforesis siguiendo la metodología de Bermúdez Guzmán *et al.*, 2016. Se usaron 3 µl de ADN extraído, 2 µl de Buffer de carga “purple (6X) New England BioLabs” y 50 µg del marcador de peso molecular 1 Kb 0.5 µg/µl “Thermo Scientific” en un gel de agarosa (0.8-1%). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 100V por 45 minutos. Finalmente se observaron los resultados en un foto-documentador ENDURO GDS LabNet. El análisis de pureza y la cuantificación del ADN extraído se realizó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific (Bermúdez Guzmán *et al.*, 2016), teniendo en cuenta como criterio de pureza las relaciones de A260:280 y A260:230 (Alejos Velázquez *et al.*, 2014).

#### **Análisis molecular:**

Se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo los protocolos de Endara *et al.* (2011), así como las secuencias de primers allí expuestas. Para un volumen final de 25 µl de la reacción de PCR, se adicionaron: 1X de PCR Rxn Buffer “Hifi buffer 10 X SMOBIO”; 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> 25 mM “Thermo Scientific”; 0.2 mM dNTPs 25 mM “SMOBIO”; 0.4 mM de cada primer 10 µM “BioSearch technologies”; 0.24 µl Taq Polimerasa Hifi-SMO 1 U/ µl “SMOBIO”; 15.46 µl de H<sub>2</sub>O grado PCR “y 1 µl de ADN con una concentración de 100 ng/µl.

Para amplificar las regiones correspondientes a cada uno de los marcadores moleculares se utilizaron los primers expuestos en la tabla 1. De igual forma las condiciones utilizadas para el conjunto de primers correspondiente a cada uno de los marcadores moleculares se encuentran en la tabla 2. Cabe resaltar que se realizaron las PCR en duplicado para cada una de las muestras de ADN obtenido.

**Tabla 1.** Secuencias de primers utilizados para cada uno de los marcadores moleculares.

Taxón	Marcador molecular	Región	Nombre del primer	Secuencias (5'-3')
Orquídeas	Plastidios (CpDNA)	MAT-K	-19 F	CGTTCTGACCATATTGCACTATG
			int F	TGAGCGAACACACATTTCTATGG
			int R	ATAAGGTTGAAACCAAAAGTC
			trk2r	ACCTAGTCGGATGGAGTAG
		TRNL-TRNF	C	CGAAATCGGTAGACGCTACG
			F	ATTTGAACTGGTGACACGAG
		YCF-1	3720F	TACGTATGTAATGAACGAATGG
			560F	GATCTGGACCAATGCACATATT
			850R	TTTGATTGGGATGATCCAAGG
			5500R	GCTGTTATTGGCATCAAACCAATAGCG
	Nucleares	ITS	N/A	ACGATTTTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG
			N/A	TAGAATTCCTCGGTCGCTCGCCGTTAC

**Tabla 2.** Condiciones de PCR de los primers utilizados para los marcadores MAT-K, YCF-1, TRNL-TRNF e ITS. Donde DI Desnaturalización inicial, D Desnaturalización, H Hibridación, E Extensión; EF Extensión final.

Nombre del primer	Dirección del primer	Nombre	Condiciones PCR	
Matk	Forward	-19 F	DI	3 min - 94°C
			D	1 min - 94°C
			H	1 min - 53°C
	Reverse	trk2r	E	2 min 30 seg - 72°C
			EF	5 min - 72°C
			Ciclos	35
	Internal F	int F	DI	3 min - 94°C
			D	1 min - 94°C
			H	1 min - 53.4°C
	Internal R	int R	E	2 min 30 seg - 75°C
			EF	5 min - 72°C
			Ciclos	35
Ycf1	Forward	3720F	DI	3 min - 94°C
			D	1 min - 94°C
			H	1 min - 47°C
	Reverse	5500R	E	2 min - 72°C
			EF	3 min - 72°C
			Ciclos	35
	Internal F	560F	DI	3 min - 94°C
			D	1 min - 94°C
			H	1 min - 52.8°C
	Intenal R	850R	E	2 min - 72°C
			EF	3 min - 72°C
			Ciclos	35

trnL-trnF	Forward	C	DI	3 min - 94°C
			D	1 min - 94°C
			H	30 seg - 62.9°C
	Reverse	F	E	30 seg - 72°C
			EF	5 min - 72°C
			Ciclos	35
ITS	Forward	ITS-F	DI	3 min - 94°C
			D	1 min - 94°C
			H	30 seg - 65°C
	Reverse	ITS-R	E	60 seg - 72°C
			EF	3 min - 72°C
			Ciclos	35

### Secuenciación:

Los productos amplificados por PCR fueron purificados y secuenciados por método de SANGER en el laboratorio MCLAB, South San Francisco, Estados Unidos. El principio del método de Sanger es el uso de Taq-polimerasa y los didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) unidos a fluorocromos. Los cuatro tipos diferentes de desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) están marcados con fluorocromos distintos, los cuales emiten una longitud de onda diferente. La separación de los fragmentos se realiza mediante electroforesis capilar, donde los fragmentos de diferentes tamaños que llegan al final del capilar son expuestos a un fluorímetro, detectando así la fluorescencia emitida por el ddNTP terminal. El color de la fluorescencia determina cual es el nucleótido allí presente. El gráfico resultante es un electroferograma, en el cual se pueden observar picos de diferentes colores. Cada color indica que nucleótido ocupa cada posición en cada secuencia de ADN (Sanger *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1986; Valderrama *et al.*, 2020).

### Análisis Filogenético:

Las secuencias obtenidas de los primers internos de *YCF-1* y *MAT-K*, al igual que las secuencias de *TRNL-TRNF* e *ITS* de cada una de las muestras usadas fueron editadas y ensambladas en GENEIOUS® 9.1.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). Las secuencias de *TRNL-TRNF*, en conjunto con secuencias de los respectivos grupos internos y externos tomadas del repositorio del NCBI fueron alineadas por el método MUSCLE utilizando MEGA X (Edgar 2004). La identificación de los diferentes géneros de orquídeas se obtuvo por medio de BLAST del NCBI. Los modelos de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustan basados en el criterio de información bayesiano se estimaron en JMODELTEST (Darriba *et al.*, 2012).

Los alineamientos resultantes fueron analizados en RAxML (Stamatakis, 2014) a partir de secuencias de *TRNL-TRNF* de especies de orquídeas disponibles en GenBank. Los árboles filogenéticos *TRNL-TRNF* se construyeron utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo GTR (General Time Reversible), especificando 5 réplicas de búsqueda independientes. Se utilizaron secuencias de *Corycium nigrescens*, *Bulbophyllum tenuifolium*, *Stelis nigriflora*, *Rudolfiella aurantiaca*, *Caularthron bilamellatum*, *Notylia barkeri* y *Soterosanthus shephardii* como taxones externos y de *Cattleya acklandiae*, *Lockhartia micrantha*, *Miltoniopsis roezlii* y *Stanhopea insignis* como taxones internos. Los árboles se dibujaron a escala y los valores de soporte de las ramas se estimaron en base a 1000 réplicas de bootstrap también usando RAxML. Para la realización de las relaciones filogenéticas se utilizaron las muestras que lograron ser alineadas (OR.3, OR.4, OR.5, OR.6, OR.7, OR.11, OR.13, OR.14 y OR.17).

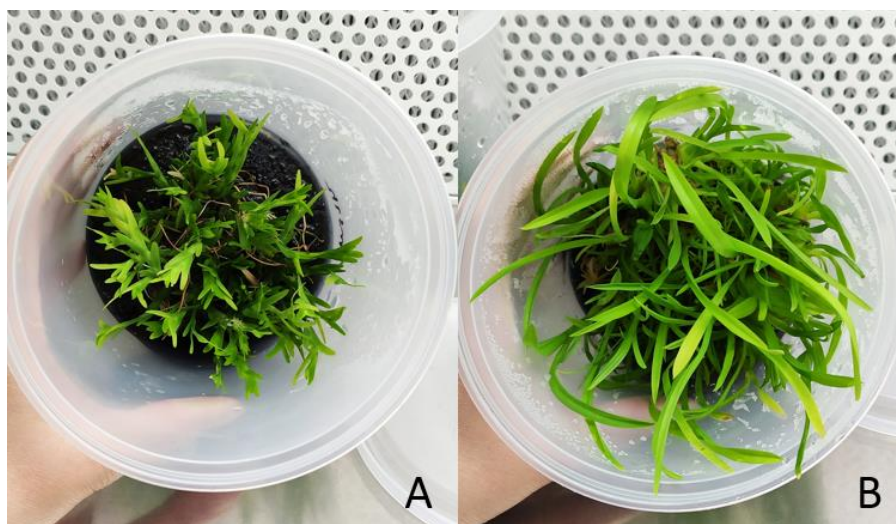
## Resultados

### Material vegetal

Las orquídeas utilizadas en este estudio pasan diferentes estadios *in vitro* como la germinación, protocornos y plántulas. Dependiendo de la especie, cada uno de los estadios puede tener una duración entre 3-6 meses. El estadio más prolongado es el de plántula el cual puede llegar a durar hasta 1 año antes de que tenga una longitud requerida para su aclimatación (endurecimiento) en invernadero (más de 5 cm).

Desde su establecimiento *in vitro*, las plántulas utilizadas en este proyecto tuvieron un promedio de 16-18 meses de crecimiento hasta lograr el desarrollo de hojas y raíces. El promedio de temperaturas de los cuartos de crecimiento para las especies utilizadas es de 23°C aproximadamente; temperatura es regulada con aires acondicionados y barreras físicas. El fotoperiodo para los estadios de germinación y protocornos de las orquídeas se controla con lámparas fluorescentes de luz blanca (Philips TL5 14W/840) en un periodo de 12 horas luz. Por otro lado, para el estadio de plántula, los fotoperiodos se basan en luz natural por 12 horas.

Se utilizó todo el tejido foliar de cada una de las muestras proporcionadas, donde cada especie se analizó por triplicado. En la figura 1 se ilustran dos ejemplos de muestras de orquídeas pertenecientes a los géneros *Lockhartia* (Figura 1.A) y *Moreliana* (Figura 1.B) en estadio de plántula.



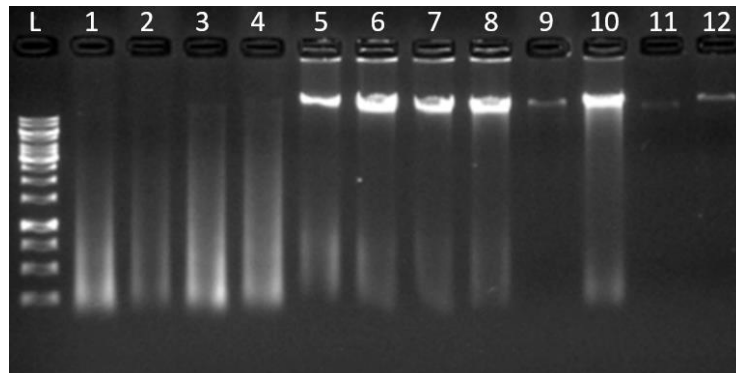
**Figura 1.** Ejemplares de germoplasmas de orquídeas en estadio de plántula obtenidas del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT en conjunto con el Spin-off Natural Vitro. **A** Género *Lockhartia*. **B** Género *Moreliana*. Fotos tomadas por Luisa Cárdenas, 2021.

### Cuantificación y análisis de la calidad del ADN extraído mediante el método CTAB

Las muestras de ADN extraído por el método CTAB fueron cuantificadas mediante espectrometría haciendo uso del NanoDrop 2000 Thermo Scientific (Tabla 3); los valores de concentración de ADN extraído se encuentran dentro del rango óptimo para la realización de PCR (Alejos Velázquez *et al.*, 2014), los valores presentados en la tabla 3 corresponden al promedio de las cuatro extracciones realizadas para cada una de las diferentes muestras. Además, la integridad del ADN extraído se observa en el gel de electroforesis (Figura 2).

**Tabla 3.** Concentración y relaciones 260:280 y 260:230 de ADN extraído de las muestras OR.3 – OR.17.

Muestra	[ng/μl]	260:280	260:230
OR.3	75.57	2.10	1.56
OR.4	90.42	1.51	0.57
OR.5	160.40	1.69	0.87
OR.6	81.03	2.01	1.57
OR.7	150.70	1.98	1.76
OR.8	122.37	2.02	2.14
OR.9	43.30	2.01	2.91
OR.10	119.64	2.06	2.31
OR.11	38.48	2.00	1.78
OR.12	85.15	1.96	1.97
OR.13	192.92	2.07	2.17
OR.14	50.92	2.02	1.44
OR.15	133.20	2.04	1.94
OR.16	101.48	2.07	2.21
OR.17	202.28	2.10	2.07



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN de los productos de extracción por método de CTAB. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 1 kb), los números 1 al 12 indican diferentes muestras de germoplasmas de orquídeas. (1 - 4 = OR.12; 5 - 8 = OR.13; 9 - 12 = OR.14).

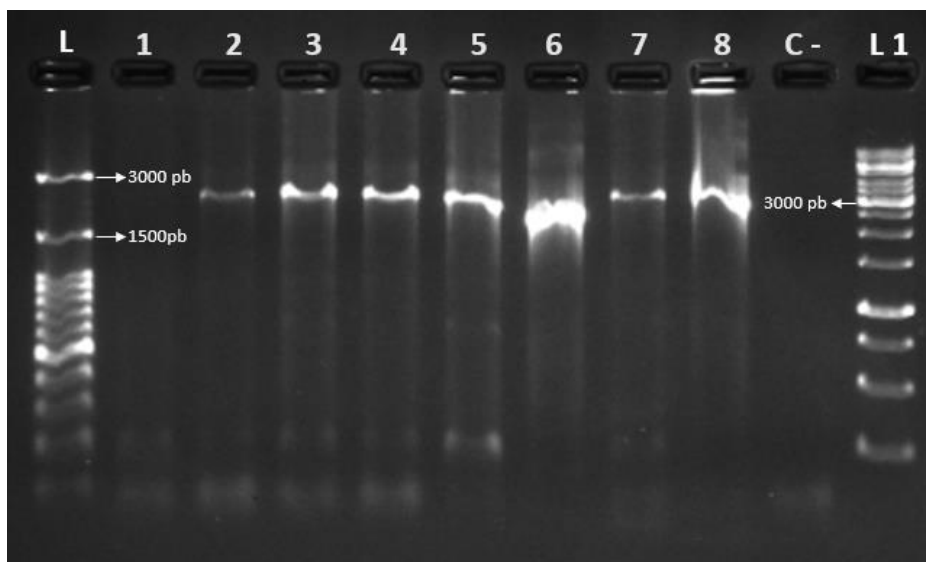
### **Amplificación de los fragmentos (*MAT-K*, *YCF-1*, *TRNL-TRNF* e *ITS*)**

Resultados obtenidos de las amplificaciones de los diferentes primers utilizados para cada uno de los marcadores moleculares (Figuras 3-13).

*MAT-K* primers externos (-19 *F* y *trk2r*):

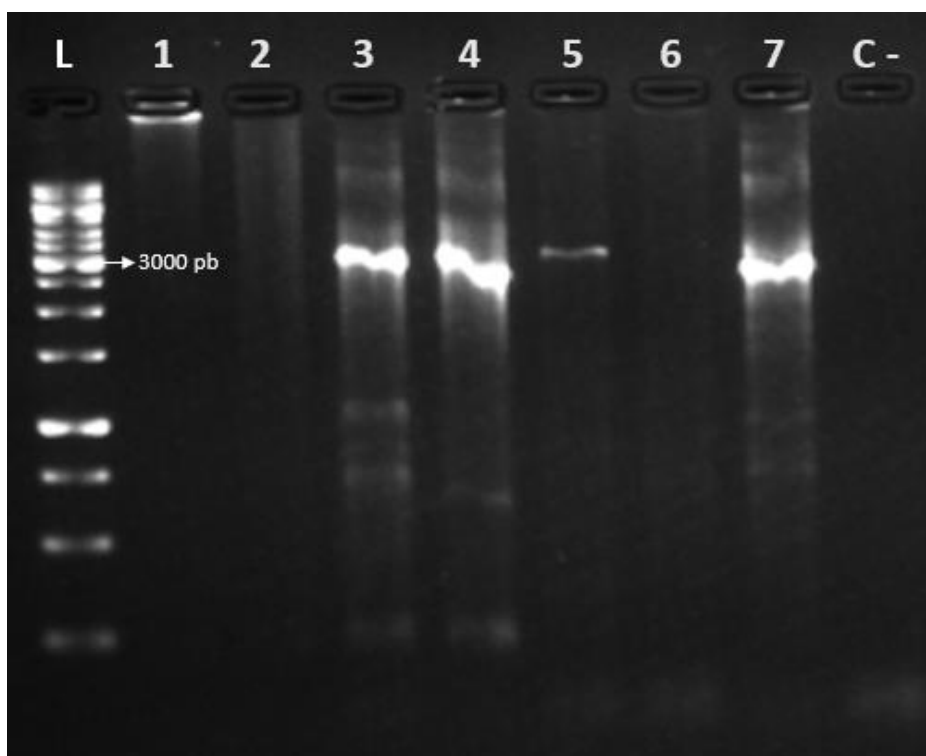
Productos de PCR obtenidos para el marcador molecular *MAT-K* haciendo uso de los primers externos -19 *F* y *trk2r*. En la figura 3 se muestra la amplificación para este marcador molecular en los pozos 1-8. Se puede evidenciar pocas inespecificidades o en el caso de del pozo 1 sin amplificación. Todas presentan un tamaño de banda de aproximadamente 3000 pb, resultados que no concuerdan con los productos esperados de aproximadamente 1500 pb para estos amplificados con los primers -19 *F* y *trk2r* (Kocyan *et al.*, 2004).





**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *MAT-K* para los primers externos. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb), los números 1 al 8 indican diferentes muestras utilizadas (1 = OR.3; 2 = OR.4; 3 = OR.5; 4 = OR.6; 5 = OR.7; 6 = OR.8; 7 = OR.9; 8 = OR.10), la letra C- indica el control negativo y la letra L1 indica el marcador de peso molecular (Ladder de 1 Kb).

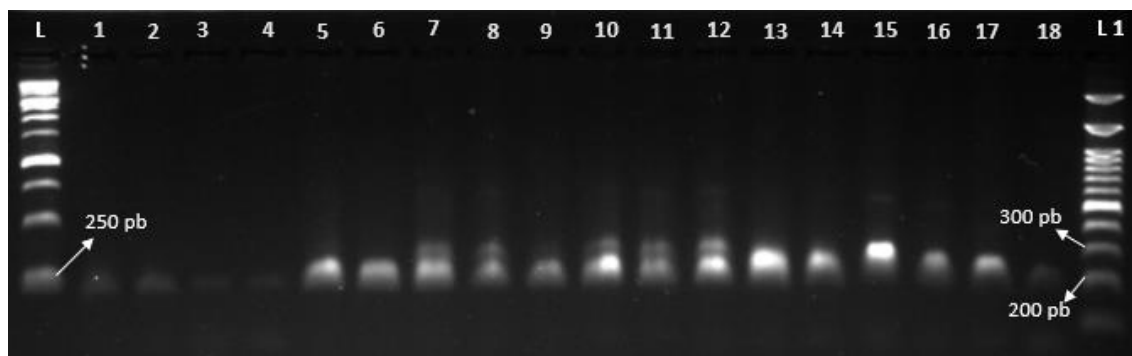
De igual forma se puede observar en los resultados de productos de PCR mostrados en la figura 4 una amplificación de aproximadamente 3000 pb para los pozos de gel de electroforesis 3, 4, 5 y 7, mientras que los pozos 1, 2 y 6 no presentaron amplificación.



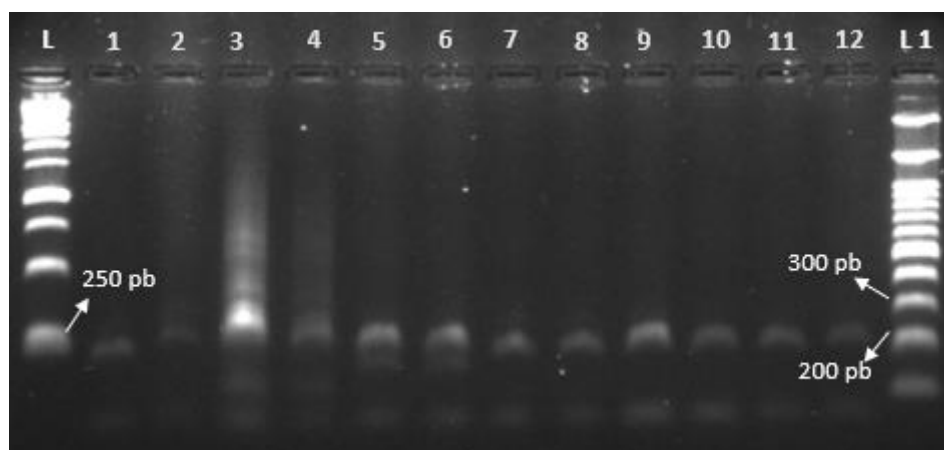
**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *MAT-K* para los primers externos. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb), los números 1 al 8 indican diferentes muestras utilizadas (1 = OR.11; 2 = OR.12; 3 = OR.13; 4 = OR.14; 5 = OR.15; 6 = OR.16; 7 = OR.17) y la letra C- indica el control negativo.

#### *MAT-K* primers internos (*int F* e *int R*):

En la amplificación con los primers internos para el marcador molecular *MAT-K*, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 250 pb (Figuras 5 y 6). Para identificar el tamaño óptimo de amplificación con estos primers, se utilizó la herramienta primer-blast del NCBI. Posteriormente, los fragmentos se purificaron y se amplificaron nuevamente. Se utilizaron las secuencias internas de este marcador para identificar el germoplasma de orquídeas ya que los fragmentos obtenidos con los primers externos no correspondieron al tamaño esperado.



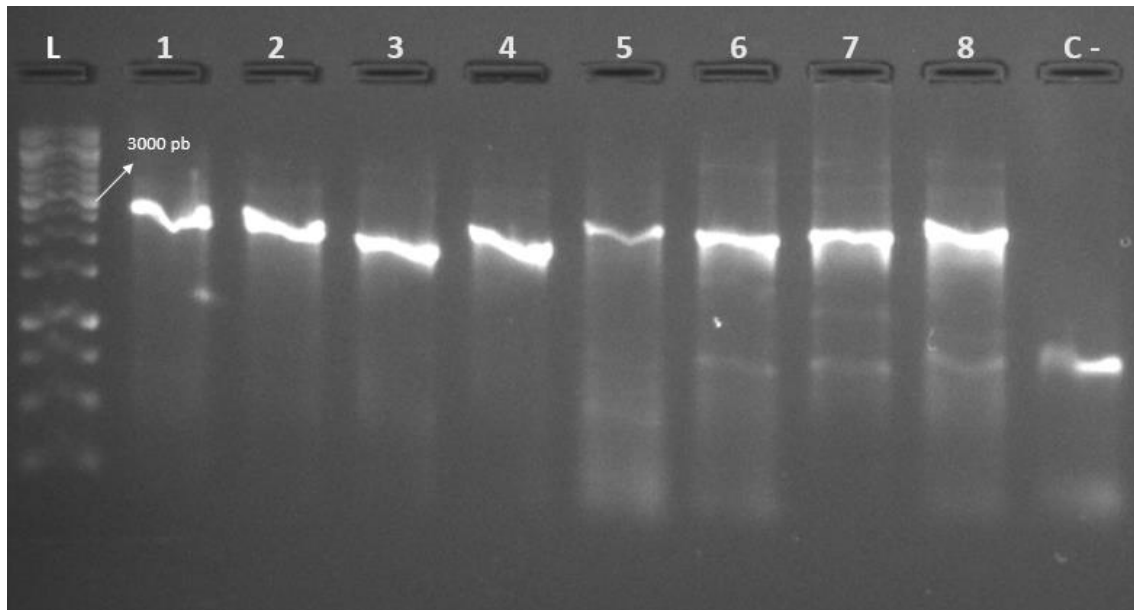
**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *MAT-K* para los primers internos. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb), los números 1 al 18 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.3; 3 y 4 = OR.4; 5 y 6 = OR.5; 7 y 8 = OR.6; 9 y 10 = OR.7; 11 y 12 = OR.8; 13 y 14 = OR.9; 15 y 16 = OR.10; 17 y 18 = OR.11) y la letra L1 indica el segundo marcador de peso molecular utilizado (ladder de 100 pb).



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *MAT-K* para los primers internos. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 1 Kb), los números 1 al 18 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.12; 3 y 4 = OR.13; 5 y 6 = OR.14; 7 y 8 = OR.15; 9 y 10 = OR.16; 11 y 12 = OR.17) y la letra L1 indica el segundo marcador de peso molecular utilizado (ladder de 100 pb).

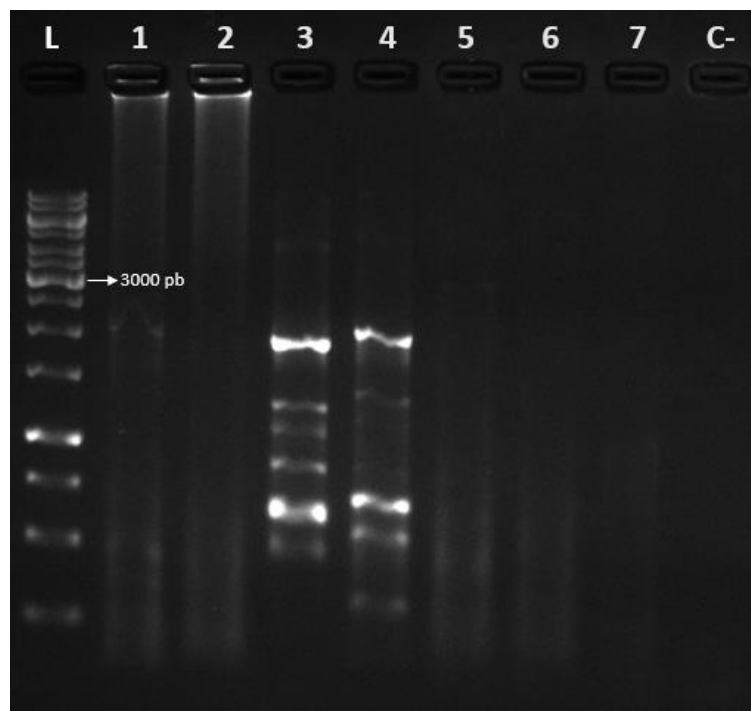
#### *YCF-1* primers externos (*3720F* y *5500R*):

Productos de PCR obtenidos para el marcador molecular *YCF-1* haciendo uso de los primers externos *3720F* y *5500R*. En la figura 7 se muestra la amplificación para este marcador molecular en los pozos 1-8. Se evidencian pocas inespecificidades en los pozos 5-8 y sin inespecificidades en los pozos 1-4. De igual forma que *MAT-K*, todos los pozos presentan un tamaño de banda de aproximadamente 3000 pb, resultados que no concuerdan con los productos esperados (~1500pb) para estos amplificados de los primers *3720F* y *5500R* (Neubig *et al.*, 2009).



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *YCF-1* para los primers externos. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb), los números 1 al 8 indican diferentes muestras utilizadas (1 = OR.3; 2 = OR.4; 3 = OR.5; 4 = OR.6; 5 = OR.7; 6 = OR.8; 7 = OR.9; 8 = OR.10) y la letra C- indica el control negativo.

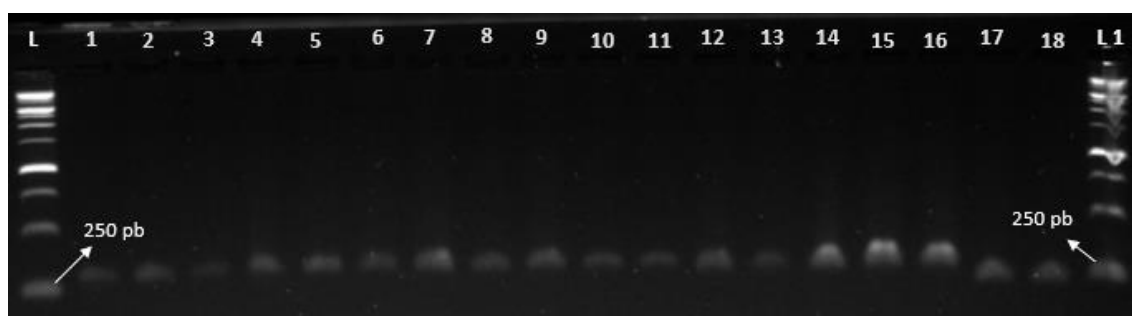
Los productos obtenidos en la figura 8 muestran muy poca amplificación o nula en los pozos 1, 2, 5, 6 y 7. En cambio en los pozos 3 y 4 se puede observar amplificación, pero con una alta cantidad de inespecificidades.



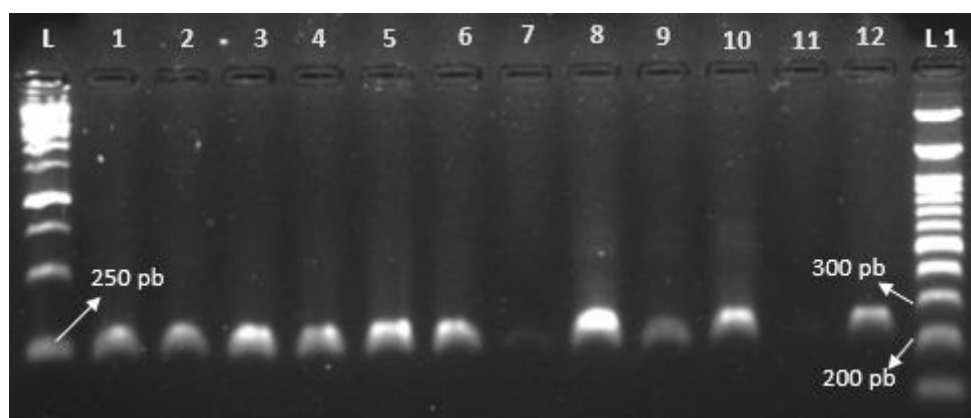
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *YCF-1* para los primers externos. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb), los números 1 al 7 indican diferentes muestras utilizadas (1 = OR.11; 2 = OR.12; 3 = OR.13; 4 = OR.14; 5 = OR.15; 6 = OR.16; 7 = OR.17) y la letra C- indica el control negativo.

#### *YCF-1* primers internos (560F y 850R):

La amplificación con los primers internos para el marcador molecular *YCF-1* al igual que en *MAT-K* se obtuvieron resultados óptimos (Figuras 9 y 10), con fragmentos de aproximadamente 250 pb, los cuales se purificaron y se amplificaron nuevamente. Se utilizaron las secuencias internas de este marcador identificar el germoplasma de orquídeas ya que los fragmentos obtenidos con los primers externos no correspondieron al tamaño esperado.



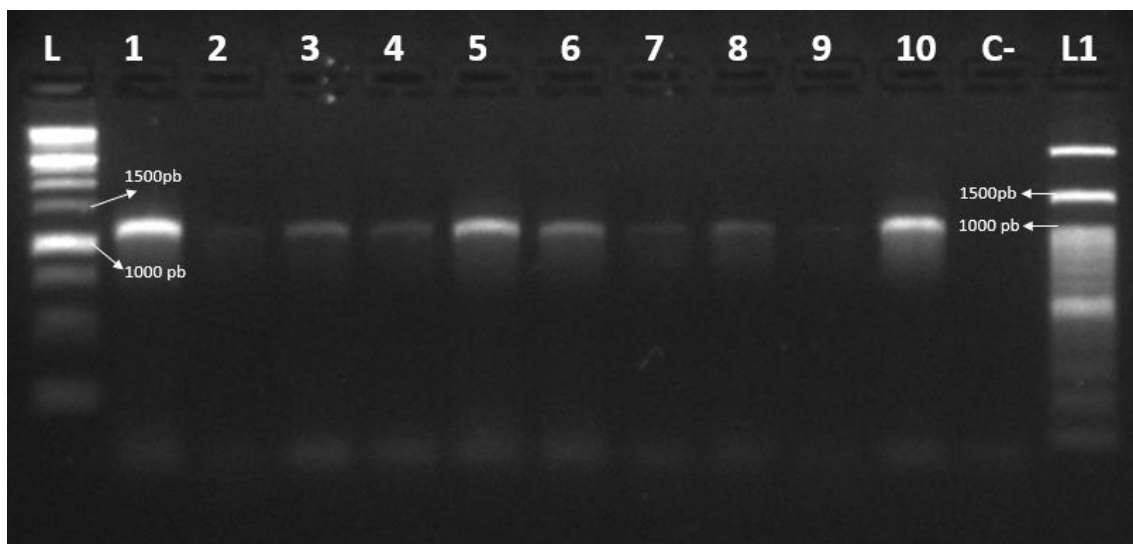
**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *YCF-1* para los primers internos. Las letras L y L1 indican el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb) y los números 1 al 18 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.3; 3 y 4 = OR.4; 5 y 6 = OR.5; 7 y 8 = OR.6; 9 y 10 = OR.7; 11 y 12 = OR.8; 13 y 14 = OR.9; 15 y 16 = OR.10; 17 y 18 = OR.11).



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *YCF-1* para los primers internos. Las letras L y L1 indican el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb) y los números 1 al 12 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.12; 3 y 4 = OR.13; 5 y 6 = OR.14; 7 y 8 = OR.15; 9 y 10 = OR.16; 11 y 12 = OR.17).

#### *TRNL-TRNF* primers (C y F):

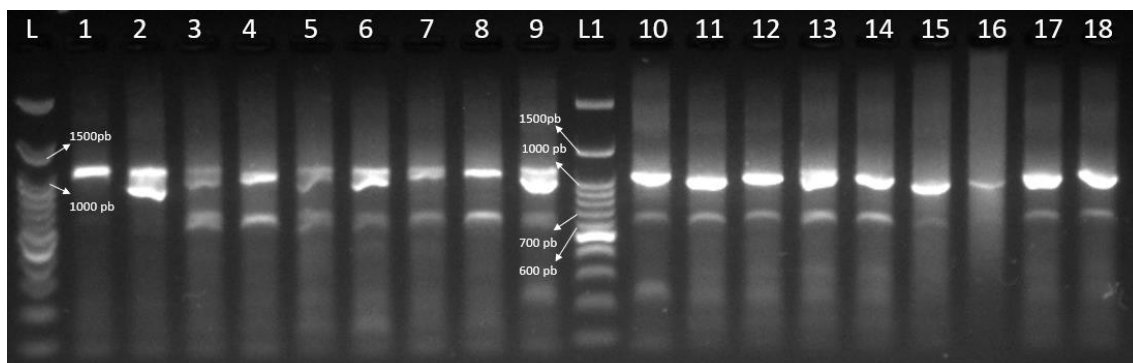
Las amplificaciones para el marcador molecular *TRNL-TRNF* (Figura 11) con los primers (C y F) presentaron mejores resultados que los obtenidos con los marcadores moleculares *YCF-1* y *MAT-K*. Los tamaños obtenidos para los productos de PCR son los esperados, *TRNL-TRNF* ~1000 pb (Ferdiani *et al.*, 2015). Además, no se evidencia presencia de inespecificidades.



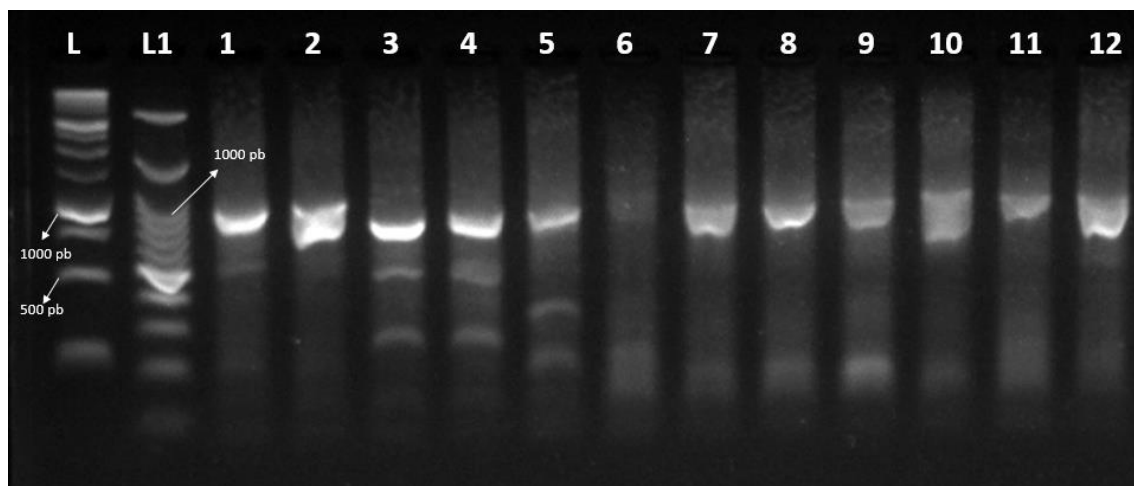
**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados en duplicado con el marcador molecular *TRNL-TRNF* para los primers *C* y *F*. La letra L indica el marcador de peso molecular usado (ladder de 1 Kb), los números 1 al 10 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.3; 3 y 4 = OR.4; 5 y 6 = OR.6; 7 y 8 = OR.7; 9 y 10 = OR.8), la letra C- indica el control negativo y la letra L1 indica el segundo marcador de peso molecular utilizado (Ladder 100 pb).

*ITS:*

En cuanto a *ITS*, los productos de PCR (Figura 12) presentaron en la gran mayoría de las muestras inespecificidades. Siendo el amplificado de mayor presencia, el esperado de aproximadamente 857 pb (Xu *et al.*, 2015).



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *ITS*. Las letras L y L1 indican el marcador de peso molecular usado (ladder de 100 pb) y los números 1 al 18 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.4; 3 y 4 = OR.5; 5 y 6 = OR.6; 7 y 8 = OR.7; 9 y 10 = OR.10; 11 y 12 = OR.14; 13 y 14 = OR.15; 15 y 16 = OR.16; 17 y 18 = OR.17).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de PCR amplificados con el marcador molecular *ITS*. Las letras L, L1 y L2 indican el marcador de peso molecular usado (ladder de 1 Kb = L. Ladder 100 pb = L1) y los números 1 al 12 indican diferentes muestras utilizadas (1 y 2 = OR.3; 3 y 4 = OR.8; 5 y 6 = OR.9; 7 y 8 = OR.11; 9 y 10 = OR.12; 11 y 12 = OR.13).

### Análisis filogenético:

La identificación molecular de las secuencias analizadas con el marcador *TRNL-TRNF* se presenta en la tabla 4. Allí, se comparan los resultados obtenidos con la base de datos de Natural Vitro para cada una de las muestras de germoplasma. Para cada una de las secuencias se puede observar que se obtuvieron valores bajos para el E-value, que indica la probabilidad que existe de que la secuencia se alinee por casualidad y valores altos para el porcentaje de identidad por pares que determina la similitud de la secuencia encontrada en la base de datos (NCBI) según el análisis en BLAST.

Se logró realizar la identificación solo a nivel de género. El género predominante es *Cattleya* con 5 de las 15 muestras analizadas. Cabe resaltar que la muestra OR.8 no corresponde a *Cattleya*, género presentado por Natural Vitro. Además, no fue posible realizar la identificación de las muestras OR.12 y OR.15, por la calidad de las secuencias.

**Tabla 4.** Identificación a nivel de género para las diferentes muestras obtenidas con su respectivo porcentaje de identidad.

Muestra	Natural Vitro		Resultados <i>TRNL-TRNF</i>		
	Género	Especie	Género	E-value	% de identidad por pares
OR.3	<i>Cattleya</i>	<i>maxima</i>	<i>Cattleya</i>	2.16E-129	100.0%
OR.4	<i>Cattleya</i>	<i>mendelii</i> (tipo)	<i>Cattleya</i>	3.67E-132	100.0%
OR.5	<i>Cattleya</i>	<i> trianae</i> (Carlos Mesa)	<i>Cattleya</i>	1.33E-53	98.0%
OR.6	<i>Cattleya</i>	<i>mendelii</i> (semi alba)	<i>Cattleya</i>	0	99.6%
OR.7	<i>Cattleya</i>	<i>schroederae</i>	<i>Cattleya</i>	1.67E-176	100.0%
OR.8	<i>Cattleya</i>	<i> trianae</i> híbrida Ca05	<i>Brassavola</i>	9.81E-159	100.0%
OR.9	<i>Dracula</i>	<i>polyphemus</i>	<i>Dracula</i>	0	99.4%
OR.10	<i>Encyclia macrochila</i>	<i>x encyclia macrochila</i> (Flor grande)	<i>Encyclia</i>	6.97E-155	100.0%
OR.11	<i>Lockhartia</i>	<i>amoema</i>	<i>Lockhartia</i>	0	99.7%

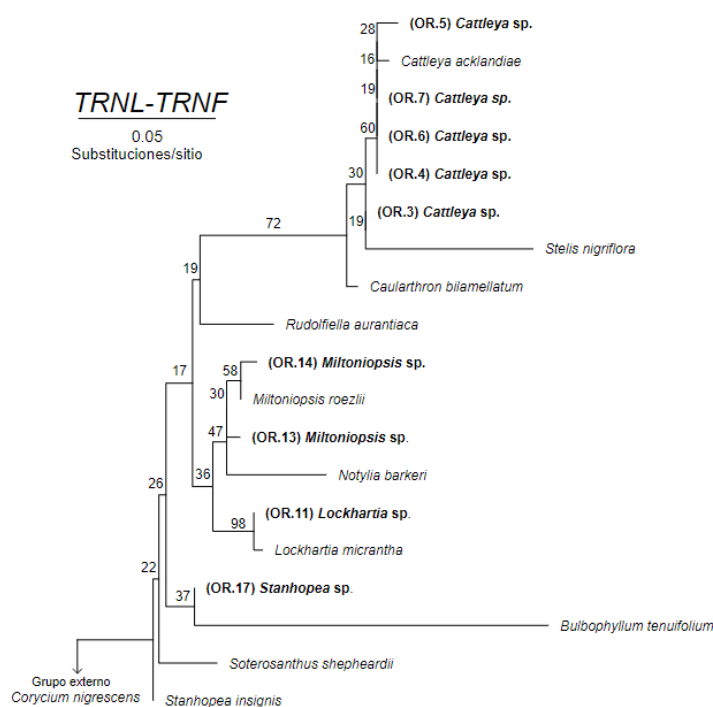
**Tabla 4.** Identificación a nivel de género para las diferentes muestras obtenidas con su respectivo porcentaje de identidad.

OR.12	<i>n</i> (¿ <i>Miltonia</i> ?)	<i>moreliana alba x self</i>	<i>N/A</i>		<i>N/A</i>
OR.13	<i>Miltoniopsis</i>	<i>phalaenopsis</i>	<i>Miltoniopsis</i>	0	99.5%
OR.14	<i>Miltoniopsis</i>	<i>vexillaria</i>	<i>Miltoniopsis</i>	0	100.0%
OR.15	<i>Peristeria</i>	<i>elata</i>	<i>N/A</i>		<i>N/A</i>
OR.16	<i>Spathoglottis</i>	<i>plicata</i> (#6)	<i>Spathoglottis</i>	2.52E-154	99.7%
OR.17	<i>Stanhopea</i>	<i>tigrina</i>	<i>Stanhopea</i>	0	99.3%

La filogenia de las secuencias obtenidas de la región de ADNcp del marcador *TRNL-TRNF* fue analizada usando RAXML con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo GTR (General Time Reversible), especificando una réplica de búsqueda independiente y 1000 réplicas de Bootstrap.

Para el análisis se obtuvieron 9 secuencias (OR.3, OR.4, OR.5, OR.6, OR.7, OR.11, OR.13, OR.14 y OR.17). La topología resultante se presenta en la figura 14. El alineamiento final incluye 11 secuencias del Genbank (EU301567.1, JF428094.1, FR837541.1, AY063450.1, AF267001.1, AF350703.1, KM458447.1, AF267040.1, FJ562347.1, FJ562417.1 y KM458453.1) y consiste en total de 20 secuencias de 613pb. El árbol filogenético presenta tres clados. El clado I incluye seis secuencias del género *Cattleya*. El clado II incluye tres secuencias del género *Miltoniopsis*. Por último, el clado III incluye dos secuencias del género *Lockhartia*.

A pesar de que se presentaron problemas en la calidad de la secuenciación y el alineamiento solo fue posible para 600 pb en vez de 1000 pb, se puede observar que los haplotipos se agrupan correctamente de acuerdo con el género correspondiente. Además, los haplotipos de cada genero presentan altos soportes en esta topología. Excepto por la muestra OR.17, la cual no se agrupó adecuadamente al haplotipo de *Santhopea insignis*.



**Figura 14.** Relaciones filogenéticas de las muestras de germoplasma de orquídeas para el marcador molecular *TRNL-TRNF*. Se utilizó el algoritmo de máxima verosimilitud basado en el modelo GTR (General Time Reversible), especificando 1 réplica de búsqueda independiente y 1000 réplicas de Bootstrap. Los números en las ramas corresponden a los valores de soporte de Bootstrap. OR.3, OR.4, OR.5, OR.6 y OR.7 corresponden a las muestras obtenidas del género *Cattleya*; OR.11 corresponde a la muestra del género *Lockhartia*; OR.13 y OR.14 corresponden a las muestras de los géneros *Miltoniopsis*; OR.17 corresponde a la muestra del género *Stanhopea*.

## Discusión

Las investigaciones de orquídeas presentan retos en cuanto a la identificación y clasificación de sus especies (Aguilar Palma, 2003), en atención a que los marcadores morfológicos tradicionales resultan ser insuficientes para definir su posición taxonómica. Esto se debe principalmente a la dificultad que existe para identificar una especie de otra gracias a su apariencia exterior, similar antes del desarrollo de la flor (Aguilar Palma, 2003; Kumar *et al.*, 2018). Asimismo, hay que tener presente que los caracteres morfológicos son afectados por condiciones ambientales por lo que podrían resultar siendo poco adecuados para un análisis preciso (Kumar *et al.*, 2018).

Para la realización de este proyecto, se obtuvo material vegetal en perfecto estado ya que no fue necesario transportar o refrigerar las muestras que fueron obtenidas y procesadas dentro de las instalaciones del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad EAFIT. El material evaluado se colectó de plántulas ya que, en el caso de tejido foliar, es recomendado colectar tejido joven que posee más células por unidad de peso que el tejido viejo; además, posee menos polisacáridos y polifenoles que pueden llegar a dificultar la extracción (Alejos Velázquez *et al.*, 2014). Una vez colectado el material vegetal, este debe almacenarse a -80°C hasta su uso o se puede hacer el proceso de extracción de ADN directamente si es obtenido de cultivos *in vitro*, como se realizó en este proyecto, pues no es necesario congelar el material (Alejos Velázquez *et al.*, 2014).

Para este proyecto se utilizó el protocolo de extracción con CTAB para hojas de *Sacha Inchi*, propuesto por Restrepo Osorio *et al.* (2020), ya que el método de extracción por CTAB ha demostrado buenas concentraciones finales en extracciones realizadas en orquídeas, entre 250-525 ng/μl en tejido de hojas (Tamari *et al.*, 2013). Además, es un protocolo eficiente en plantas el cual permite una buena separación entre el ADN, las proteínas y los polisacáridos hasta obtener resultados de extracción de ADN con relaciones de ADN/Proteínas y ADN/Contaminantes óptimos para realizar procesos de PCR (Garrido Ortiz y León, 2015). Como se puede observar en la tabla 3, se cuantificaron las concentraciones de ADN mediante espectrometría haciendo uso del NanoDrop. Aunque no se obtuvo una mayor concentración de ADN a las presentadas por Tamari *et al.* (2013) y los resultados mostraron un menor rendimiento, lograron ser óptimos para la realización de PCR. De acuerdo con Alejos Velázquez *et al.* (2014) se requieren entre 10-200 ng de ADN para realizar una PCR exitosa. Es decir, por cada 50 μl de muestra se deben obtener al menos 5 ng/μl de ADN; en el caso de este estudio el rango de concentración de ADN obtenido se encuentra entre 38.5 ng/μl y 202.3 ng/μl y con un promedio de 109.86 ng/μl.

Al medir la calidad del ADN extraído con el Nanodrop, se obtuvieron resultados óptimos en la mayoría de las muestras, es decir, entre 1.7 y 2.0; en promedio 1.98 para la relación 260:280 (ADN/Proteínas). En cuanto a la relación 260:230, los valores deberían encontrarse en un rango de 2.0-2.2; como puede observarse en la tabla 3 las muestras que presentaron un menor valor al rango óptimo, son muestras que se pueden encontrar con contaminantes como carbohidratos o fenol (Alejos Velázquez *et al.*, 2014).



Además de cuantificar la concentración y la calidad del ADN extraído, es necesario comprobar la integridad del ADN, esto se logra haciendo uso del gel de electroforesis. De acuerdo con la figura 2 se puede observar en los primeros pozos (1-4) un “sendero luminoso” en el carril de la muestra el cual indica que el ADN allí presente se encuentra en su mayoría fragmentado. A diferencia de los primeros pozos, del pozo 5-12 se observa que el ADN no se encuentra, en su mayoría, fragmentado; de hecho, se observa buena integridad del ADN extraído. Al no contar con RNasa en el proceso de extracción, se puede observar presencia de ARN en la mayoría de los pozos. Para las muestras degradadas, fue necesario realizar de nuevo el protocolo de extracción de ADN.

En esta investigación se utilizaron cuatro marcadores moleculares, tres de genoma plasmídico (*TRNL-TRNF*, *YCF-1* y *MAT-K*) y un gen nuclear (*ITS*) con el fin de evaluarlos en la identificación a nivel molecular de germoplasma de orquídeas. Estos marcadores moleculares se eligieron ya que el espaciador intergénico que se encuentra entre los genes *TRNL-TRNF* (codificantes de ARN de transferencia de leucina y fenilalanina), es considerado un locus importante para las comparaciones taxonómicas en plantas. Igualmente, los marcadores *YCF-1* y *MAT-K* se han indicado como marcadores que proporcionan una mayor información para la identificación entre especies estrechamente relacionadas dentro géneros de orquídeas (Chattopadhyay *et al.*, 2017; Calderón Parreño y Prexl Zurita, 2019). Los genes del ARN ribosomal (rRNA) junto con sus regiones espaciadoras se han utilizado en gran medida como fuente de información filogenética, ya que representan algunas de las secuencias más conservadas en eucariotas (Moreno Palacios, 2018). Estas regiones de rRNA poseen información útil para la sistemática de plantas desde especie hasta nivel genérico (Moreno Palacios, 2018). Además, la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS) se considera una de las mejores regiones para deducir las filogenias fuertemente apoyadas de los grupos de plantas (Chattopadhyay *et al.*, 2017).

Para lograr la amplificación de los diferentes marcadores moleculares, con sus respectivos primers, fue necesario realizar gradientes de temperatura para el óptimo anillamiento de estos con los productos de ADN extraído (Ishii y Fuki, 2001). Una vez realizados los diferentes gradientes de temperatura para cada uno de los conjuntos de primers de los marcadores moleculares, se realizaron las diferentes amplificaciones (Figuras 3-13) con todas las muestras disponibles de ADN de orquídeas (OR.3-OR.17).

Haciendo uso de los primers externos *-19F* y *trk2r* para el marcador molecular *MAT-K*, no se lograron obtener los tamaños de amplificados esperados, posiblemente debido a que dichos primers fueron previamente utilizados para identificar orquídeas pertenecientes únicamente al género *Scaphosepalum* (Endara *et al.*, 2011). Cabe resaltar que los géneros trabajados en este estudio fueron diferentes (*Cattleya*, *Dracula*, *Encyclia*, *Lockartia*, *Miltonia*, *Miltoniopsis*, *Peristeria*, *Spanthoglotitis*, *Stanhopea*).

El principal problema al utilizar primers en diferentes géneros y familias de orquídeas para el marcador molecular *MAT-K* es que es una región de alta variabilidad, lo cual genera dificultades para el diseño de primers que sean universales (Chase *et al.*, 2007). Este problema podría superarse mediante mejoras en el diseño de los primers y generando primers específicos (Chase *et al.*, 2007). Diferentes estudios han demostrado el uso de otro conjunto de primers específicos *390F* y *1326R* diseñados por Cuénoud *et al.* (2002), los cuales han servido para amplificar el marcador molecular *MAT-K* con tasas de amplificación particularmente buenas en la sub-tribu Oncidiinae y los géneros *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum* y *Holcoglossum* (Cuénoud *et al.*, 2002; Lahaye *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2017).

La región del marcador molecular *YCF-1* es demasiado amplia (5500 pb) e incluso resulta ser más variable que la de *MAT-K*, presentando así dificultades para el diseño de primers universales; razón por la cual ha recibido menos atención en estudios con propósitos de sistemática molecular (Neubig *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2017). A diferencia del estudio realizado por Neubig *et al.* (2009), amplificar la región 5' del marcador molecular para los diferentes géneros usados no fue factible. Esto quiere decir que no se logró obtener 1500 pb, el tamaño de amplificado esperado, sino un tamaño de 3000 pb; se puede observar en los resultados obtenidos con los primers externos 3720F y 5500R (Figuras 7 y 8). Por esta razón no se pudo utilizar *YCF-1* para la identificación de los géneros y especies usadas, y es principalmente debido a la dificultad con el diseño de los primers gracias a la alta cantidad de indels en *YCF-1* (Neubig *et al.*, 2009). Sin embargo, el creciente número de estudios de secuencias de ADN de genoma del cloroplasto completo puede permitir la identificación de regiones conservadas que son útiles para el diseño de los primers (Neubig *et al.*, 2009). Es probable que se obtenga más éxito cuando se generen primers-específicos dentro de las diferentes familias de orquídeas (Neubig *et al.*, 2009).

En este estudio se evidenció una buena amplificación del marcador molecular *TRNL-TRNF* haciendo uso de los primers *C* y *F*. Como se evidencia en los resultados se puede ver una amplificación de ~1000 pb (Figura 11), tamaño correspondiente a este marcador molecular; además, no se evidencia presencia de inespecificidades. *TRNL-TRNF* también se ha utilizado en diferentes estudios filogenéticos de taxones de orquídeas como *Orphrys*, *Angraecinae*, *Epidendroideae*, *Arethuseae*, *Vandae*, *Bulbophyllum*, *Coryciinae*, *Cypripedium*, *Tangtsinia* y *Orchiade* (Vu *et al.*, 2017). La dificultad para lograr obtener secuencias útiles para realizar la identificación molecular de los géneros aquí utilizados fue el retraso presentado en el envío de las muestras al laboratorio MCLAB en Estados Unidos para su secuenciación por SANGER; consecuencia de la actual contingencia por el COVID-19. El envío de las muestras se tardó un aproximado de siete días en llegar al laboratorio, rompiendo por completo la cadena de frío y afectando la integridad del ADN en las muestras almacenadas. Por lo tanto, se obtuvieron resultados de secuencias con una calidad baja/nula (0%-18%) dificultando su uso para identificar los germoplasmas de orquídeas.

Por otro lado, haciendo uso de los primers obtenidos para amplificar el marcador molecular *ITS*, se pudo obtener un tamaño de banda cercano a los 860 pb esperados para esta región; aun así, se pueden observar inespecificidades en la amplificación. De igual forma no se descarta aún la posibilidad de éxito en la identificación molecular de orquídeas haciendo uso de los primers de *ITS* propuestos en el estudio de Endara *et al.* (2011) y utilizados en esta investigación, ya que la secuenciación óptima para esta región no fue posible debido a los problemas de envío de los productos de PCR.

Las secuencias obtenidas con los primers internos de *YCF-1* y *MATK*, se editaron y ensamblaron con GENEIOUS® 9.1.8. El problema de usar estas secuencias para intentar identificar a nivel de genero/especie es que son secuencias cortas (250 pb) comparadas con los marcadores moleculares completos (1500 pb). Es decir, no es posible distinguir con exactitud a qué genero/especie pertenece cada una de las muestras y es necesario complementar esta información con el uso de los primers externos. Por esta razón no se incluyen en este trabajo los resultados obtenidos de estas secuencias.

Asimismo, las secuencias obtenidas para los marcadores moleculares *TRNL-TRNF* e *ITS*, fueron editadas y ensambladas haciendo uso de GENEIOUS® 9.1.8. Al momento de evaluar la calidad

de las secuencias obtenidas, se observó en ambos una muy baja calidad; sin embargo, fue posible utilizar las secuencias de *TRNL-TRNF*, caso contrario a las secuencias de *ITS*.

Haciendo uso de las secuencias obtenidas con *TRNL-TRNF* fue posible hacer la identificación a nivel de género de 13 de 15 muestras de orquídeas utilizadas en este estudio, tal como se muestra en la tabla 4. Cabe resaltar que, de las 13 muestras identificadas se logró el alineamiento de nueve (OR.3, OR.4, OR.5, OR.6, OR.7, OR.11, OR.13, OR.14 y OR.17), debido principalmente a la calidad de los resultados de secuenciación. Para la identificación de las secuencias se tomó en cuenta el menor valor para el parámetro E-value, que indica la probabilidad que existe de que la secuencia se alinee por casualidad; y el mayor porcentaje de identidad por pares que determina la similitud de la secuencia encontrada en la base de datos (NCBI). Estos parámetros son esenciales para saber a qué organismo corresponde la secuencia analizada. No se logró realizar la identificación de las muestras OR.12 y OR.15 debido a la calidad de las secuencias obtenidas, que se encontraron entre 0%-0.5% (high quality).

Además, se observa en la tabla 4 que la mayoría de las muestras identificadas corresponden a las registradas en la base de datos del laboratorio de Natural Vitro; se demuestra así el éxito en la identificación a nivel de género del germoplasma de estas orquídeas haciendo uso del marcador molecular *TRNL-TRNF*. Como excepción a lo anterior, el género que se identificó para la muestra OR.8 no corresponde al género propuesto en la base de datos de Natural Vitro. Cabe resaltar que OR.8 corresponde al género *Cattleya* de acuerdo con Natural Vitro y la identificación molecular mostró que pertenece al género *Brassavola*. Sin embargo, de acuerdo con Adams y Aderson (1958), las orquídeas del género *Cattleya* y las del género *Brassavola* pueden generar híbridos entre ellas, por lo cual se cree que la orquídea identificada se trate de un híbrido entre estos dos géneros.

Finalmente, en el análisis filogenético realizado con el marcador *TRNL-TRNF* (Figura 14), se puede observar que las muestras de germoplasma de orquídeas analizadas en este estudio presentan la misma topología que las obtenidas por otros autores como Freudenstein y Chase (2015), donde evalúan las relaciones filogenéticas de la subfamilia Epidendroideae. Por otro lado, los haplotipos se agrupan también de forma correcta con cada una de las secuencias de referencia previamente identificadas por estos autores (Freudenstein y Chase 2015). Cabe resaltar que los bajos soportes en la filogenia obtenida no son significativos para este estudio ya que el objetivo no fue evaluar las relaciones evolutivas del grupo, sino realizar una identificación taxonómica molecular de las secuencias obtenidas. Teniendo esto en cuenta, se puede observar que los soportes más altos hacen referencia a cada uno de los haplotipos de los géneros evaluados.

La secuencia del género *Stanhopea* no se agrupó con el haplotipo esperado, esto se debe a que la secuencia obtenida para esta muestra (OR.17) es más corta que la utilizada para el grupo interno. En un futuro una de las opciones para mejorar estos trabajos sería cambiar los primers para que las secuencias sean más largas; otra opción sería hacer uso de primers internos que logren mejorar los resultados de amplificación para la región *TRNL-TRNF*. Sin embargo, la opción óptima sería rediseñar los primers para obtener un tamaño de secuencia mayor que mejore los análisis genéticos y hacer de nuevo el análisis con un mayor número de secuencias.

A pesar de no haberse agrupado con el haplotipo, la identificación del género para esta muestra si fue correcta (*Stanhopea*), y puede ser que no se agrupara por la calidad de la secuencia o por lo anteriormente expuesto.

Es evidente que, en este tipo de estudios de identificación de orquídeas, los rasgos fenotípicos resultan ser limitantes ya que representan mayor costo, dificultades y tiempo para la recopilación de datos que ayuden a la identificación entre géneros o especies de orquídeas. Por esta razón, los curadores de germoplasma migran hacia métodos de caracterización más confiables y rápidos como el uso de marcadores moleculares, siendo estos neutrales para el tejido, la edad y no se ven afectados por el ambiente (Kumar *et al.*, 2018).

## Conclusión

En esta investigación se resalta la importancia de realizar estudios afines, para el desarrollo de técnicas replicables de identificación molecular de orquídeas y así generar conocimiento de base científica y tecnológica que ayude al aprovechamiento sostenible y responsable de orquídeas a nivel nacional. Teniendo en cuenta lo anterior y de acuerdo con el objetivo planteado, se logró evidenciar la identificación molecular a nivel de género de germoplasma de orquídeas haciendo uso del marcador molecular *TRNL-TRNF* y se recomienda su uso para la identificación molecular de orquídeas pertenecientes a la Subfamilia Epidendroideae. Asimismo, se proponen primers que puedan ayudar a mejorar los resultados obtenidos para los marcadores moleculares *MAT-K*, *YCF-1* e *ITS*, debido a la dificultad que existe de generar primers universales para los diferentes grupos de orquídeas.

## Agradecimientos

Agradecemos a todo el equipo de investigadores de la Spin-off Natural Vitro y al Departamento de Ciencias Biológicas por su apoyo en la realización de esta investigación. Al pregrado de Biología y los proyectos de investigación del Profesor Villanueva-Mejía por el soporte en insumos y equipo de laboratorio necesarios para la ejecución experimental. Al equipo de la expedición Bio Anorí por facilitarnos implementos necesarios para el proyecto. A Juan Manuel Martínez Cerón (EAFIT) por el apoyo y revisión en el análisis molecular. Agradecemos también a los estudiantes de maestría de la Universidad EAFIT Camilo Cano, Danna Susunaga, María Clara Arrieta, Laura Gómez y Diana Farfán, al igual que a la técnica de laboratorio del Departamento de Ciencias Biológicas Ana María Vélez Patiño y a los egresados Isabel Adarve y David Carmona por su apoyo en los procesos de laboratorio realizados. También a la egresada Verónica Vélez Sampedro por su apoyo en la revisión del manuscrito. Finalmente agradecemos de forma especial a los empleados Deisy Alejandra Arboleda Álvarez y Wilson Arenas Álvarez, de la empresa de Aseo y Sosténimiento que presta sus servicios a la Universidad EAFIT, por su calidez y compañía durante las jornadas de trabajo en el laboratorio de Biología Molecular.

## Referencias

- Adams, H., & Anderson, E. (1958). A Conspectus of Hybridization in the Orchidaceae. *Evolution*, 512-518.
- Aguilar Palma, S. (2003). Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas. *Escuela agrícola panamericana*.
- Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. d., & Cornejo Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1.

- Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y., & Satake, M. (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences. *The Japanese Society of Pharmacognosy*, 133-138.
- Bellusci, F., Pellegrino, G., Palermo, A. M., & Musacchio, A. (2008). Phylogenetic relationships in the orchid genus *Serapias* L. based on noncoding regions of the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 986-991.
- Bermúdez Guzmán, M., Guzmán González, S., Orozco Santos, M., Velázquez Monreal, J. J., Buenrostro Nava, M. T., & Michel López, C. Y. (2016). Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 897-910.
- Calderón Parreño, C., & Prexl Zurita, J. C. (2019). Filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* (Orchidaceae) usando el marcador molecular ycf1. Quito: Universidad de las Américas.
- Castellanos Castro, C., & Torres Morales, G. (2018). Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá*, 328.
- Cavero, M., Collantes, B., & Patroni, C. (1991). Orquídeas del Perú. Centro de datos para la conservación del Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., Van Den Berg, C., Madriñan, S., Petersen, G., . . . Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 295-299.
- Chattopadhyay, P., Banerjee, G., & Banerjee, N. (2017). Distinguishing Orchid Species by DNA Barcoding: Increasing the Resolution of Population Studies in Plant Biology. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 711-720.
- Cuénoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R., & Chase, M. W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid RBCL, ATPB, and MATK DNA sequences. *American Journal of Botany*, 132-144.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 772-772.
- Deepti Srivastava, M. K. (2020). DNA Barcoding of Endemic and Endangered Orchids of India: A Molecular Method of Species Identification. *Pharmacognosy Magazine*, 290-299.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 1792-1797.
- Endara A, L., Williams, N. H., & Whitten, W. M. (2011). Filogenia molecular preliminar de *Scaphosepalum* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Lankesteriana*, 245-252.
- Ferdiani, D. I., Devi, F. L., Koentjana, J. P., Milasari, A. F., Nur'aini, I., & Semiarti, E. (2015). Molecular characterization of natural orchid in South slopes of Mount Merapi, Sleman regency, Yogyakarta. *In AIP Conference Proceedings*, 1-4.
- Freudenstein, J. V., & Chase, M. W. (2015). Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of botany*, 665-681.
- Garrido Ortiz, G. M., & León, A. (2015). Aislamiento y evaluación de la integridad de ADN mediante el método de extracción CTAB y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en

muestras de balanceados de consumo animal preparado a base de maíz. Universidad San Francisco de Quito.

Herrera, P., Kottke, I., Molina, C. M., Méndez, M., & Suárez, J. P. (2017). Generalism in the interaction of Tulasnellaceae mycobionts with orchids characterizes a biodiversity hotspot in the tropical Andes of Southern Ecuador. *Mycoscience*, 1-11.

Ishii, K., & Fuki, M. (2001). Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and environmental microbiology*, 3753-3755.

Kearse, M., Moir, M., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 1647-1649.

Kocyan, A., Qiu, Y. L., Endress, P. K., & Conti, E. (2004). A phylogenetic analysis of Apostasioideae (Orchidaceae) based on ITS, trn LF and mat K sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 203-213.

Kress, J. W., & Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE*, e508.

Kress, J. W., Erickson, D. L., Jones, A. F., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., & Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS*, 18621-18626.

Kumar, M., Chaudhary, V., Sharma, V. R., Sirohi, U., & Singh, J. (2018). Advances in biochemical and molecular marker techniques and their applications in genetic studies of orchid: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 806-822.

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., . . . Savolainen, V. (2014). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS*, 2923-2928.

Li, H., Xiao, W., Tong, T., Li, Y., Zhang, M., Lin, X., . . . Guo, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *Nature*, 1-15.

Lin Dong, W., Nan Wang, R., Yao Zhang, N., Wei Bing, F., Min Feng, F., & Zhong Hu, L. (2018). Molecular Evolution of Chloroplast Genomes of Orchid Species: Insights into Phylogenetic Relationship and Adaptive Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 716.

Moreno Palacios, M. (2018). Filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* en el Ecuador, utilizando ITS como marcador molecular. Escuela superior Politécnica de Chimborazo.

Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 4321-4325.

Neubig, K. M., Whitten, W. M., Carlswald, B. S., Blanco, M. A., Endara, L., Williams, N. H., & Moore, M. (2009). Phylogenetic utility of ycf1 in orchids: a plastid gene more variable than matK. *Plant Systematics and Evolution*, 75-84.

Neyland, R., & Urbatsch, L. E. (1996). Phylogeny of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae) inferred from NDHF chloroplast gene sequences. *American Journal of Botany*, 1195-1206.

Restrepo Osorio, C., Gil Correa, A., Chamorro Gutiérrez, L., Ramírez Rios, V., Álvarez, J. C., & Villanueva Mejía, D. (2020). Efficient direct shoot organogenesis and genetic stability in micropropagated *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.). *BMC research notes*, 1-7.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 5463-5467.

- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 674-679.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 1312-1313.
- Tamari, F., Hinkley, C. S., & Ramprashad, N. (2013). A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 113-118.
- The Plant List*. (15 de 4 de 2021). Obtenido de <http://www.theplantlist.org/>
- Valderrama, J. M., Ortigosa, F., & Cañas, R. A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros en la Biología*, 19-25.
- Vallejo, M. I., López, D., García, N., Castro, C., Guiot, S., & Rodríguez, M. A. (2018). Orquídeas nativas cultivadas en las provincias del Tequendama y Sumapaz (Cundinamarca). Guía para la identificación y el cultivo de algunas especies de orquídeas nativas de Cundinamarca, 17-115.
- Vu, T., Le, T., Nguyen, T., Tran, D., & Tran, H. (2017). Review on molecular markers for identification of Orchids. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 62-75.
- Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghay-Marooof, M. A., & Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2097–2100.
- Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., . . . Huang, L. (2015). Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PLOS ONE*, 1-12.